مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره چهارم، پیاپی شانزدهم، بهار ۱۳۹۵ (۲۵-۱۹)

مقایسه روش‌های متفاوت استخراج DNA از بافت‌های مختلف حلزون مخروطی دریایی *Conus coronatus*

حلیمه رجبی[۱*]، حسین ذوالقرنین[۲]، محمد تقی رونق[۳]، احمد سواری[٤]، محمد شریف رنجبر[٥]

۱. دانشجوی دکترای بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲. دانشیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۳. استادیار گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
٤. استاد گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۵. استادیار گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱/۳۱ – تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۵)

چکیده

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب از نیازهای اساسی ژنتیک مولکولی است. این مطالعه با هدف معرفی روش بهینه استخراج DNA از بافت‌های مختلف (عضله پا، سیفون و هارپن) حلزون دریایی *Conus coronatus* از شاخه نرم‌تنان با روش‌های فنل–کلروفرم، استات آمونیوم و CTAB Cetyl (trimethylammonium bromide) انجام شد. برای انجام این مقایسه حدود ۳۰ نمونه کونوس از سواحل پارک زیتون جزیره قشم جمع‌آوری شد. پس از تشریح نمونه‌ها در شرایط استریل، بافت‌های مختلف کونوس جداسازی و در اتانول ۹٦٪ قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. استخراج DND از بافت‌های مختلف و با روش‌های متفاوت انجام شد. پارامترهای کمی و کیفی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر و ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بالاترین کیفیت DNA استخراجی در روش استات آمونیوم بوده و باندهای حاصل روی ژل فاقد آلودگی بودند و DNA استحصالی از بافت عضله پا دارای بهترین کیفیت و کمیت بود.

واژه‌های کلیدی: *Conus coronatus*، استخراج DNA، نرم‌تنان، اسپکتوفتومتر.

Comparison of Three Different DNA Extraction Methods from Different Tissue Samples of the Marine Cone Snail, *Conus coronatus*

Halimeh Rajabi[1], Hossein Zolgharnen[2], Mohammad Taghi Ronagh[3], Ahmad Savari[4], Mohammad Sharif Ranjbar[5]

1. Ph.D. Student in Marine Biology. Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshar, Iran
2. Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshar, Iran
3. Assistant Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshar, Iran
4. Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshar, Iran
5. Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
(Received: - Accepted:)

Abstract

Genomic DNA extraction with high quantity and quality is the basic necessities of molecular genetic studies. The aim of this study is the applicability of different DNA extraction methods as the easiest and fastest methods for and their efficiency with different tissue qualities (foot, siphon, harpoon) from marine cone snail *Conus coronatus*, Mollusca with Phenol-chloroform, Ammonium acetate and CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) methods. About 30 samples were collected from Qeshm Island, Zeyton Park. After dissection on sterile condition, different kinds of Conus tissues were separated and preserved in ethanol 96%, then transferred to the lab. DNA extraction were performed from different tissues with different methods. Spectrophotometer and electrophoresis on 1 % agarose gel were used for evaluating the quality and quantity of extracted DNA samples. According to the results, Ammonium acetate method showed sharper bands, without esmire in comparison with other extraction methods and DNA extracted from foot tissue had the best quality and quantity.

Keywords: *Conus coronatus*, DNA extraction, Mollusca, Spectrophotometer.

* نویسنده مسئول: E-mail: halimeh.rajabi@gmail.com

مقدمه

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب از نیازهای اساسی ژنتیک مولکولی است. لذا امروزه برای استخراج DNA از بافت‌های مختلف و روش‌های مختلف استفاده می‌شود. بافت‌های مختلف مقادیر متفاوتی از DNA دارند که با توجه به روش‌های مختلف استخراج DNA، این مقادیر یکسان نیستند (De Bruyn *et al*., 2011). همچنین کیفیت DNA نمونه‌ها براساس نحوه نگهداری نمونه‌ها، مدت زمان نگهداری آنها، تکنیک مورد استفاده، همچنین گونه مورد مطالعه و بافت مورد نظر، متفاوت است. معمولاً کیفیت بافتی که در اتانول نگهداری می‌شود یا بافت فریز شده در دمای بسیار پایین و یا بافت تازه، بهتر از بافت‌های قدیمی و تثبیت شده است (Eschbach, 2012). اصول کلی استخراج DNA چهار مرحله است:

۱- شکستن سلول برای از بین بردن دیواره هسته با استفاده از شوک اسمزی و شوینده‌های آنیونی

۲- هضم پروتئین‌ها با استفاده از پروتئیناز K که فعالیت بهینه این آنزیم در دمای ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد است

۳- رسوب پروتئین‌ها از محلول DNA

۴- رسوب DNA با استفاده از اتانول مطلق سرد (Brauer *et al*., 2012).

معمولاً کیفیت DNA استخراج شده و عدم وجود آلودگی حاصل از وجود RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهایی که برای آنزیم تک پلیمراز در واکنش زنجیره ای ای پلیمراز (PCR) و آنزیم های برشی محدودیت و ممانعت ایجاد می کنند، توسط ژل آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر سنجیده می‌شود (Lodhi *et al*., 1994).

هدف از این تحقیق بررسی روش بهینه استخراج DNA و بافت مناسب جهت استخراج، در حلزون مخروطی *Conus coronatus* می‌باشد. در بین نرمتنان دریایی سمی، حلزون‌های مخروطی با تقریباً ۷۰۰ گونه شکارچی (Olivera, 2006) بیشترین تعداد گونه را دارا هستند (Bernaldez *et al*., 2011). حلزون‌های مخروطی از شاخه نرمتنان و رده گاستروپودها و خانواده Conidae هستند که در مناطق بین جذر و مدی نواحی گرمسیری و زیر گرمسیری اقیانوس هند و مرکز اقیانوس آرام پراکنش دارند و به دلیل داشتن پپتیدهایی با توالی های کوتاه ۱۸-۴۰ آمینو اسیدی به نام کونوپپتیدها که دارای خواص دارویی هستند، مورد توجه بسیاری از زیست شناسان هستند (Kass *et al*., 2010). اما متأسفانه در داخل کشور تاکنون مطالعه مولکولی روی کونوس‌های سواحل خلیج فارس انجام نشده و این مقاله در حقیقت بخشی از یک تحقیق گسترده در مورد این موجودات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها

از سواحل پارک زیتون جزیره قشم (موقعیت جغرافیایی: N 26^{0}55.631 / E 056^{0}15.209)، ۳۰ نمونه حلزون مخروطی (گونه *Conus coronatus*) که از گونه‌های غالب در سواحل خلیج فارس است با استفاده از اطلس نرم‌تنان در محیط شناسایی شده، جمع‌آوری گردیدند و سپس در آزمایشگاه با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز CO1 از نظر مولکولی نیز شناسایی شدند. نمونه‌ها همراه با آب دریا به آزمایشگاه منتقل و در شرایط استریل تشریح شدند. بافت‌های مختلف هر نمونه (عضله پا، سیفون و هارپن) جداسازی و در اتانول ۹۶٪ قرار داده شده و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردیدند.

نمونه‌ها قبل از انجام مراحل استخراج، از اتانول خارج شده و پس از خشک شدن به قطعات بسیار کوچک تقسیم شده و در میکروتیوپ‌های ۱/۵ قرار داده شدند. با توجه به به لزوم انجام سه روش استخراجی و همچنین کوچکی بافت‌های مورد

استفاده و نبودن امکان استفاده مجدد از همان بافت، به هر روش تعداد ۱۰ نمونه اختصاص داده شد. لذا در هر روش ۱۰ عضله پا، ۱۰ هارپن و ۱۰ بافت سیفون مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌ها کاملاً در شرایط آزمایشگاهی یکسان انجام گرفته و محلول‌ها به صورت تازه قبل از پروسه استخراج که حدود سه روز طول می‌کشد تهیه گردیدند.

روش فنل کلرفرم

به میکروتیوپ‌های حاوی ۱۵۰ میلیگرم از بافت ریز شده نمونه حدود ۳۰ میکرولیتر محلول SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) و ۵۰۰ میکرولیتر STE (Saline Tris EDTA) به همراه ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K افزوده شده و به مدت یک شب در بن ماری در دمای ۵۵ درجه قرار گرفتند. پس از ورتکس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه، در زیر هود ۵۰۰ میکرولیتر فنل تازه به آنها افزوده و در ظرف یخ قرار داده شدند. و بعد از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فاز رویی به میکروتیوپ های جدید منتقل و به آنها ۵۰۰ میکرولیترکلروفرم افزوده شد. مجدد فاز رویی جدا و به آن ۴۰ میکرولیتر استات سدیم و ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ افزوده و در دمای ۲۰- به مدت یک شبانه روز قرار داده شدند. فاز رویی جدا و به آن ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده و پس از سانتریفیوژ محلول الکل را خارج و میکروتیوپ‌ها را روی دستمال کاغذی وارونه قرار داده تا خشک شوند، سپس به هر میکروتیوپ، ۵۰ میکرولیتر TE (Tris EDTA) افزوده شد (Hillis & Moritz, 1990).

روش استات آمونیوم

به میکروتیوپ‌های حاوی بافت، ۳۰ میکرولیتر SDS 20% و۶۰۰ میکرولیتر STE به همراه ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K افزوده شده و به مدت یک شب در بن ماری در دمای ۵۵ درجه قرار گرفتند. بعد از افزودن۶۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۷/۵ مولار نمونه‌ها ۱۵ دقیقه ورتکس شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اسانتریفیوژ شدند. فاز رویی به میکروتیوپ‌های جدید منتقل و به آن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ سرد افزوده و مجدد سانتریفیوژ انجام شد. سپس محلول را دور ریخته و به آن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده و با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. در آخر محلول الکل را دور ریخته و پس از خشک شدن میکروتیوپ‌ها به آنها ۷۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر افزوده شد (Lucentini *et al*., 2006a).

روش CTAB

به میکروتیوپ‌های حاوی ۱۰۰ میلی گرم بافت نمونه ، حدود ۷۰ میکرولیتر محلول SDS 10% و۶۳۰ میکرولیتر CTAB Cetyl trimethylammonium (bromide) به همراه ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K افزوده شده و به مدت یک شب در بن ماری در دمای ۵۵ درجه قرار گرفتند. سپس به میکروتیوپ‌ها ۲۰ میکرولیتر محلول‌های بتامرکاپتواتانول و ۲۴۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار افزوده شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. در زیر هود حدود ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم به آنها افزوده و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فاز رویی به میکروتیوپ‌های جدید منتقل شد. فاز رویی جدا و به جهت رسوب DNA، به آنها ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد افزوده و ۱۰ دقیقه سانتریقیوژ انجام شد. جهت شست و شوی DNA از ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ استفاده شد و پس از سانتریفیوژ، محلول الکل را خارج و میکروتیوپ‌ها را روی دستمال کاغذی وارونه قرار داده تا خشک شوند، سپس به هر میکروتیوپ، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد (Breuer *et al*., 2012).

بررسی کمی و کیفی نمونه‌ها

برای بررسی کمیت DNA استخراجی از دستگاه

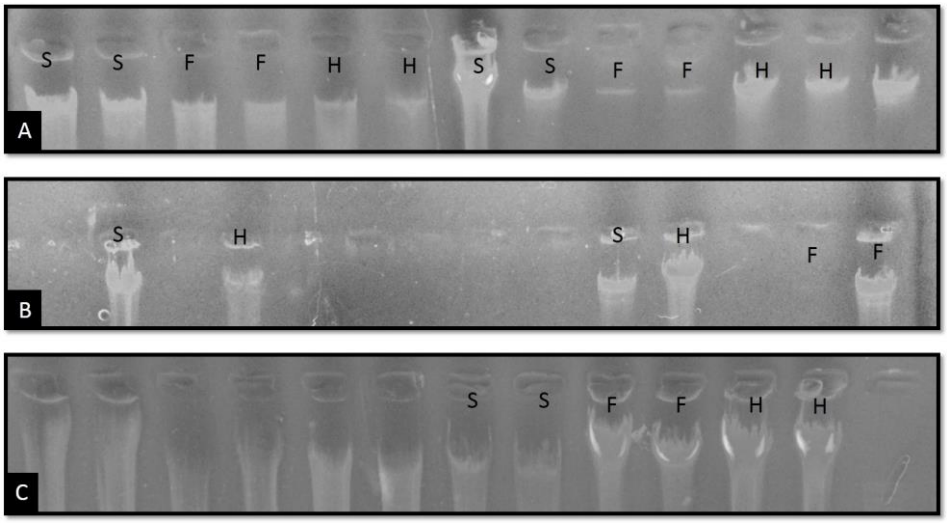
اسپکتوفتومتر استفاده کردیم. حدود ۱۹۵ میکرولیتر از آب مقطر را در ظرف مربوطه قرار داده و پس از صفر کردن دستگاه مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه را با آب مقطر مخلوط کرده و سل را در دستگاه قرار داده تا غظت DNA و میزان آلودگی را بسنجد. مقدار جذب نوری نمونه در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ محاسبه گردید. اگر این نسبت برابر ۱/۸ باشد در این صورت کیفیت DNA مناسب است، و اگر از این مقدار بیشتر باشد DNA دارای ناخالصی RNA است و اگر از این مقدار کمتر باشد دارای ناخالصی با فنل یا پروتئین است. در نهایت، مقایسه میانگین نتایج حاصل از کمیت DNA استخراج شده، از طریق آنالیز واریانس مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای بررسی کیفیت DNA نمونه‌ها، حدود ۵ میکرولیتر از نمونه را به همراه ۳ میکرولیتر لودینگ بافر به طور کامل مخلوط کرده و در چاهک های ژل آگارز ۱٪ تزریق کردیم. سپس در تانک ژل که حاوی بافر TBE (Tris Boric acid EDTA) بوده با ولتاژ ۷۵ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شدند. مقایسه کیفیت باندها با توجه به شارپ و پر رنگ بودن آنها و بدون اسمیر بودن آنها انجام گرفت.

نتایج

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، استخراج DNA از هر سه بافت مورد نظر با روش استات آمونیوم صورت گرفت (شکل ۱). البته کیفت DNA استخراجی و همچنین کمیت آن در مورد بافت‌های عضله پا و سپس هارپن بهتر از سیفون بود (جدول ۱). باندهای حاصل از روش استخراجی استات آمونیوم فاقد اسمیر و آلودگی بودند، به ویژه باندهای حاصل از عضله پا. در مقابل بیشترین آلودگی در باندهای حاصل از روش استخراجی فنل کلروفرم مشاهده گردید.

کمیت DNA استخراجی نیز روندی مشابه کیفیت آن در مقایسه سه روش استخراجی داشت. پس از روش استات آمونیوم، روش CTAB نتایج بهتری را نسبت به روش فنل- کلروفرم نشان داد (نمودار۱). و همچنین در روش استات آمونیوم نتایج مربوط به عضله پا و هارپن بهتر از سیفون بود. تفاوت‌های میان کمیت DNA در بافت‌های مختلف و با روش‌های مختلف با علایم در جدول ۱ نشان داده شده است. مثلاً در روش استات آمونیوم عضله پا تفاوت معنی‌داری را نسبت به بافت دیگر دارد که با a نشان داده شده است.

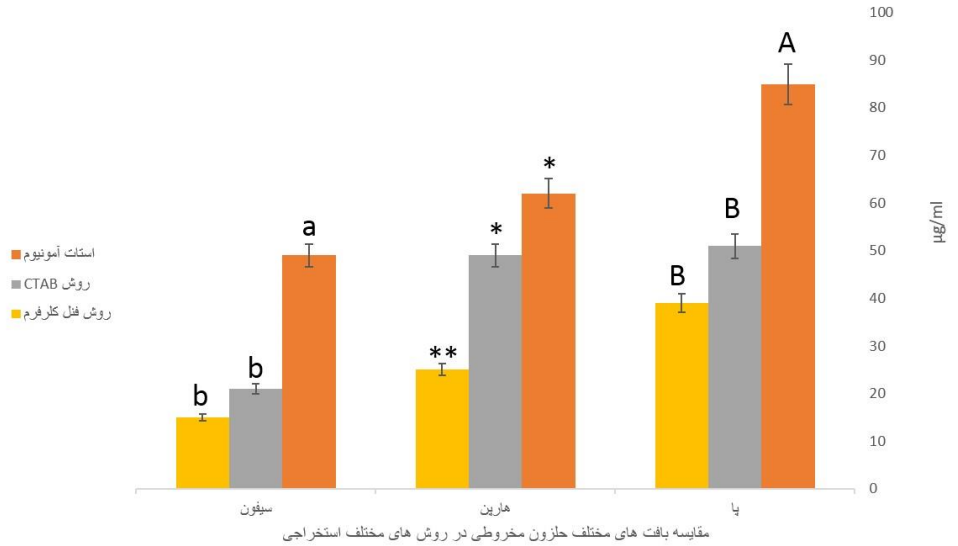


شکل ۱. تصاویر ژل مربوط به DNA استخراجی از بافت‌های مختلف *Conus coronatus* به روش‌های مختلف (تصویر A: روش استات آمونیوم، تصویر B: روش CTAB، تصویر C: روش فنل-کلروفرم (اختصارات: S: سیفون، F: عضله پا، H: بافت‌هارپن))

جدول ۱. میانگین خلوص و کمیت DNA استخراج شده با روش‌های مختلف

روش‌های استخراج DNA مورد مطالعه	تعداد	عضله پا		بافت‌هارپن		بافت سیفون	
		DNA (OD)	DNA µg/ml	DNA (OD)	DNA µg/ml	DNA (OD)	DNA µg/ml
روش استات آمونیوم	۱۰	۱/۸۱±۰/۰۵	۸۵±۲۶^{a}	۱/۷۷±۰/۰۸	۶۲±۱۱^{b}	۱/۹۳±۰/۰۵	۴۹±۷^{b}
روش CTAB	۱۰	۱/۷۳±۰/۰۳۷	۵۱±۲۰^{A}	۱/۸۷±۰/۰۸۶	۴۹±۱۱^{A}	۱/۹۷±۰/۰۸	۲۱±۷ ^{B}
روش فنل–کلروفرم	۱۰	۱/۶۵±۰/۱	۳۹±۲۱*	۱/۵۹±۰/۰۷۳	**۲۵±۱۲	۱/۷۵±۰/۰۸۶	۱۵±۵**

علایم متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) در قیاس سطرها با یکدیگر می‌باشد.



نمودار ۱. مقایسه غلظت DNA بافت‌های مختلف حلزون مخروطی (عضله پا، هارپن و سیفون) با روش‌های مختلف استخراج DNA (استات آمونیوم، روش CTAB و روش فنل کلروفرم). علایم متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) در قیاس بافت‌ها به روش‌های مختلف می‌باشد.

بحث

در این تحقیق از سه روش استات آمونیوم و CTAB و فنل–کلروفرم به منظور استخراج DNA برای سه نوع بافت استفاده شد. در روش استات آمونیوم تمامی بافت‌ها نتایج نسبتاً خوبی را از نظر کیفیت DNA داشتند. یافتن روش مناسب استخراج DNA برای استحصال DNA با کیفیت و کمیت مطلوب مطالعه Lucentini *et al.* (2006b)، بر روی ماهیان آب شیرین (مقایسه باله‌ها و فلس‌ها) و مطالعه Eschbach (2012)، بر روی اردک ماهی (ماهیچه و فلس و باله) انجام گردیده است. با وجود اینکه در کشور روش‌های مختلف استخراج DNA به ویژه روی ماهیان انجام شده است تاکنون مطالعه‌ای روی حلزون‌های مخروطی صورت نگرفته و در حقیقت این تحقیق اولین قدم در بررسی روش‌های مختلف در این گونه است. استخراج DNA اولین و مهمترین نیاز در اجرای تحلیل‌های ژنتیکی، مانند تشخیص جهش و پی بردن به توالی و عملکرد بخش‌های مختلف ژنوم می‌باشد. موفقیت‌های ناشی از استخراج بهینه DNA، به خلوص و غلظت بالای DNA استخراج شده وابسته است. امروزه از کیت‌های تجاری برای استخراج DNA استفاده می‌شود که با وجود هزینه‌هایی که تحمیل می‌گردد و راحتی انجام پروسه‌های کار، همیشه نتایج مطلوب حاصل نمی‌گردد (Beacham *et al.*, 2010). لذا پروتکل‌های

متعددی برای بافت‌های مختلف و گونه‌های مختلف گسترش یافته است (Bandyopadhyay *et al*., 2006).

در مورد کمیت بافت عضله پا، بیشترین کمیت DNA و کمترین میزان آلودگی را نشان می‌دادند در صورتی که بافت سیفون دارای مقداری آلودگی با RNA بود. در دستگاه اسپکتوفتومتر، مقدار جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲–۱/۸ باشد، نشان دهنده این است که جذب عمدتا به علت اسید نوکلئیک است و کیفیت و خلوص DNA مطلوب است. اعداد کمتر از ۱/۸ نشانگر آلودگی پروتئینی یا فنلی هستند و اعداد بالاتر از ۲ نشان‌دهنده آلودگی RNA می‌باشند (Wilfinger *et al*., 1997).

روش CTAB از نظر کیفیت DNA استحصالی در رتبه بعد از استات آمونیوم بوده اما در مورد کمیت DNA در این روش نیز بیشترین میزان DNA از عضله پا حاصل گردید.

الکتروفورز با ژل آگارز معیار مهمی برای محاسبه غلظت DNA و عدم شکستگی آن و نیز کنترل آلودگی‌های ناشی از وجود چربی، پروتئین‌ها و غلظت‌های بالای کلسیم که مهارکننده‌های بالقوه PCR هستند، می‌باشد. میزان خلوص DNA یک عامل بسیار مهم در کارهای آزمایشگاه ژنتیک مولکولی است (Brauer *et al*., 2012). تصاویر ژل الکتروفورز در روش فنل کلروفرم موید این مطلب بود، همچنین مقادیر اسپکتوفتومتر، عمدتاً از ۱/۸ کمتر بوده و دلیل آن می‌تواند آلودگی فنلی یا پروتئینی در این روش استخراجی باشد. همچنین PH آب مورد استفاده و قدرت یونی آن، در تخمین مقادیر جذبی DNA اثر گذار است. بازهای پورین و پریمیدین مسئول حداکثر جذب در ناحیه ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر است. هرچند که طیف جذبی برای بازهای نوکلئیک اسید و نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها به‌طور قدرتمندی وابسته به PH بوده زیرا که درجه یونیزاسیون بازها در PHهای مختلف متفاوت است (Wilfinger *et al*., 1997).

مطالعات ژنتیکی جمعیت به صورت پذیرفتن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) وابسته است و ماده اولیه برای انجام این نوع مطالعات، DNA استخراج شده با کیفیت مطلوب می‌باشد. کیفیت بافتی که DNA از آن استخراج می‌شود به فاکتورهایی مثل نوع بافت و نحوه نگهداری و مدت زمان نگهداری بستگی دارد (De Bruyn *et al*., 2012). روش‌های مختلف استخراج DNA، باعث استحصال کمیت و کیفیت‌های متفاوتی می‌گردد (Hansen, 2002). در نتیجه با توجه به این تحقیق، روش استات آمونیوم علاوه بر نتایج استحصالی، از نظر مواد به‌کار برده شده در این روش و صرف زمان کمتر بهینه‌تر از سایر روش‌هاست. به‌طور کلی روش‌های نمک اشباع که استات آمونیوم هم یکی از آنهاست روش‌هایی سریع و ساده می‌باشند که DNA استحصالی کیفیت مطلوبی داشته و در نتیجه در تجزیه و تحلیل ژنوتیپی در آزمایشگاه‌هایی که محدودیت منابع مالی و زمانی دارند روش مناسبی است.

REFERENCES

Bandyopadhyay, PK.; Stevenson, BJ.; Cady, MT.; Olivera, BM.; Wolstenholme, DR.; (2006). Complete mitochondrial DNA sequence of a Conoidean gastropod, Lophiotoma (Xenuroturris) cerithiformis: gene order and gastropod phylogeny. Toxic; 48: 29-43.

Beacham, TD.; McIntosh, B.; Wallace, C.; (2010). A comparison of stock and individual identification for sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in British Columbia provided by microsatellites and single nucleotide polymorphisms. Can J Fish Aqua Sci; 67: 1274-1290.

Bernaldez, J.; López, O.; Licea, A.; Salceda, E.; Arellano, RO.; Vega, R.;

Soto, E.; (2011). Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca^{2+} channels. Toxic; 57: 60-67.

Brauer, A.; Kurz, A.; Stockwell, T.; Heidler, J.; Wittig, I.; Kauferstein, S.; Mebs, D.; Stocklin, R.; Remm, M.; (2012). The Mitochondrial Genome of the Venomous Cone Snail *Conus consors*. Plos one; 7(12): 1-10.

De Bruyn, M.; Parenti, LR.; Carvalho, GR.; (2011). Successful extraction of DNA from archived alcohol-fixed white-eye fish specimens using an ancient DNA protocol. J Fish Biol; 78: 2074-2079.

Eschbach, E.; (2012). Ascertaining optimal protocols for DNA extraction of different qualities of pike (*Esox lucius*) tissue samples – a comparison of commonly used solid phase extraction methods. Env Biotech; 8 (1): 7-14

Hansen, MM.; (2002). Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. Mol Ecol.; 11: 1003-1015.

Hillis, DM.; Moritz, C.; (1990). Molecular taxonomy. Sinauer Associates Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. U .S. A. P: 120

Kaas, Q.; Westermann, J.; Craik, DJ.; (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. Toxic; 55(8): 1491-1509.

Lodhi, MA.; Guang-Ning, Y.; Weeden, NF.; Reisch, BI.; (1994). Simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars Vitis species Ampelopsis. Plant Mol Biol Rep; 12(1): 6-13.

Lucentini, L.; Caporali, S.; Palomba, A.; Lancioni, H.; Panara, F.; (2006a). A comparison of conservative DNA extraction methods from fins and scales of freshwater fish: a useful tool for conservation genetics. Conser. Genet; 592-613.

Lucentini, L.; Palomba, A.; Lancioni, H.; Natali, M.; Panara, F.; (2006b). A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells. Mol Ecol; 6: 257-260.

Olivera, BM.; (2006). Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. j Biol Chem; 281(42): 31173-31177.

Shivji, MS.; Rogers, SO.; Stanhope, MJ.; (1992). Rapid isolation of high molecular weight DNA from marine macroalgae. Mar Ecol Prog Seri; 84: 197-203.

Wilfinger, WW.; Mackey, K.; Chomczynski, P.; (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. BioTech; 22(3): 475-481.